

TOMATE: HONGOS PATÓGENOS, BACTERIAS ENDÓFITAS Y BIOCONTROL



Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI)

Expositor: Dr. BALATTI, Pedro A.

Grupo de trabajo: S. M. Y. López, M. E. E. Franco, C. G. Lucentini, R. Medina, M. C. N. Saparrat

<https://www.agro.unlp.edu.ar/laboratorio/centro-de-investigaciones-en-fitopatologias-cidefi>
cidefi@gmail.com

INTRODUCCIÓN

En Argentina el tomate es el segundo cultivo hortícola en importancia, pero además es una actividad en crecimiento. En la actualidad, el 83% de la superficie cultivada con tomate corresponde al cultivo bajo cubierta, lo que resultó en la aparición de nuevos problemas fitosanitarios. El cultivo de tomate es atacado por enfermedades y plagas que provocan pérdidas de rendimiento. Particularmente en el cinturón hortícola platense se destinan más de 268 hs al cultivo de tomate. Las enfermedades foliares son un serio problema a nivel regional debido a su incidencia y severidad, y a la ineficiencia de los tratamientos de control, lo que genera crecientes pérdidas económicas debido a la disminución del rendimiento del tomate en la región. En el CIDEFI una de las líneas de trabajo consiste en el estudio de dos patologías: el moho de la hoja del tomate (Cladosporiosis) provocada por el hongo *Passalora fulva* y la mancha gris de la hoja del tomate, que es provocada por *Stemphylium lycopersici*, *S. solani* y *S. botryosum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Aislamiento, cultivo, caracterización morfológica y molecular de *P. fulva* y *S. lycopersici*. A partir de hojas de tomate con síntomas y signos típicos del moho de la hoja y de la mancha gris de la hoja de tomate, se obtuvieron cultivos monospóricos (Rollán *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2017a). Éstos, se caracterizaron en base a la velocidad de crecimiento, color y elevación de la colonia, pigmentación del medio y esporulación, y características de los conidios. La virulencia de los aislamientos de *S. lycopersici* se estudió *in vitro* (Franco *et al.*, 2017a).

A partir de los cultivos monospóricos de los hongos, se realizó la extracción de ADN genómico usando el kit *Wizard® Genomic DNA Purification kit*. Se amplificaron los espacios transcritos internos (ITS, *Internal transcribed spacer*, Franco *et al.*, 2017a), los genes de avirulencia (Avr) y los genes ECP de *P. fulva* (Stergiopoulos *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2015), cuyo polimorfismo se estudió. Para los aislamientos de *S. lycopersici*, se amplificó además, el gen de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*gpd*) (Franco *et al.*, 2017a).

b) Estudios de diversidad genética de *S. lycopersici*. La diversidad genética entre los aislamientos de *S. lycopersici* se estudió mediante ISSR-PCR (Bornet and Branchard, 2001). Se obtuvieron

las secuencias genómicas borradores de tres aislamientos de *S. lycopersici*, CIDEFI 216, CIDEFI 212 y CIDEFI 213, los que se ensamblaron usando el *software* SOAP *denovo*. La identificación y predicción de genes se realizó utilizando la metodología descrita por Franco (2015). Se estudió el genoma mitocondrial del aislamiento CIDEFI 216 (Franco *et al.*, 2017b). Se determinó el efecto de los metabolitos solubles de los aislamientos CIDEFI 212, CIDEFI 213 y CIDEFI 216 cuando crecen en distintos medios, en ensayos en hoja desprendida (Franco *et al.*, 2017a) y se los caracterizó mediante estudios fotoquímicos (Espectros UV-VIS y de fluorescencia, Medina *et al.*, 2018).

c) Bacterias endófitas. Se extrajo ADN de muestras de hojas, tallos, raíces y frutos de plantas esterilizadas superficialmente y se amplificaron las regiones V1-V3 del gen *16S rDNA*, con lo que se determinó la estructura de la diversidad de los microbiomas de la planta de tomate. Se identificaron y caracterizaron bacterias endófitas de semillas de dos cultivares de tomate, Silverio y Elpida. Se evaluó la actividad biocontroladora de endófitos en patógenos como *Alternaria alternata*, *Corynespora cassicola* y *S. lycopersici*, pertenecientes al cepario del CIDEFI. También se evaluó la actividad antimicrobiana de los filtrados de endófitos y de los compuestos volátiles contra los mismos fitopatógenos (López *et al.*, 2018). Se evaluaron a campo las bacterias con mayor potencial y para ello se usó un diseño en bloques con cuatro repeticiones y seis tratamientos. Se realizaron dos inoculaciones, una al momento de la siembra y otra al trasplante. A lo largo del ciclo de la planta, se midió semanalmente, el número de hojas, el largo de una hoja y altura del tallo, como así también, se determinó la incidencia y severidad de las patologías que aparecieron, principalmente las estudiadas.

RESULTADOS

a) Hongos fitopatógenos. Se obtuvo una colección de 20 aislamientos que fueron identificados como *P. fulva* en base a sus características de crecimiento, que desarrollan colonias violáceas cuando crecen en agar agua, con elevación y velocidad de crecimiento característica. Las secuencias de ITS obtenidas dieron >99% de similitud con secuencias correspondientes a *P. fulva* cuando se alinearon en la base de datos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, se logró amplificar los genes *avr* y *ecp*, marcadores moleculares de esta especie. Por otro lado, se encontró la prevalencia de la raza 2 sobre la raza 0 entre los representantes aislados. Cuando se analizaron las secuencias correspondientes a los genes *avr* y *ecp* se encontró un alto grado de polimorfismo, principalmente en la secuencia codificante del gen *avr4E* y del gen *ecp1*, como también en la secuencia no codificante del gen *avr4*. También se encontró una delección de 359 pb en el gen *ecp5* del aislamiento CIDEFI 326. Los resultados sugieren la constante evolución, producto de la presión ejercida sobre la población fúngica debido al uso de cultivares resistentes a la enfermedad.

A partir de tejido con sintomatología de la mancha gris del tomate, se obtuvo una colección de 27 aislamientos que fueron identificados como *S. lycopersici*, en base a las características morfológicas y herramientas moleculares (ITS y *gpd*). Todos estos aislamientos fueron capaces de producir la sintomatología característica de la mancha gris de la hoja del tomate, aunque con distinta severidad (Franco *et al.*, 2017a).

Por otro lado, la colección mostró diversidad cultural y genética mediante el uso de marcadores moleculares (Franco *et al.*, 2017a). En base a estos estudios se escogió el aislamiento CIDEFI 216, como aislamiento muy virulento y esporulado, y los aislamientos CIDEFI 212 y CIDEFI 213, como representantes poco virulentos, siendo el primero no esporulado y el último esporulado, para los estudios posteriores. Se obtuvieron las secuencias genómicas borrador de los aislados CIDEFI 212, CIDEFI 213

y CIDEFI 216 (Tabla 1). A partir del genoma del aislamiento CIDEFI 216, CIDEFI 212 y CIDEFI 213 se predijeron 36, 37 y 39 clústers de metabolitos secundarios.

| | CIDEFI 216 | CIDEFI 212 | CIDEFI 213 |
|--------------------|-------------|--------------|--------------|
| Scaffolds | 419 | 599 | 787 |
| N50 | 498,048 | 280,402 | 185,479 |
| GC [%] | 50.5 | 51.9 | 51.2 |
| Tamaño estimado | 40.60 Mpb | 34.16 Mpb | 34.99 Mpb |
| Cobertura promedio | 77.39 X | 33.3 X | 41.7 X |
| ORF predichos | 8998 | 9024 | 9079 |
| tRNAs predichos | 94 | 115 | 103 |
| rRNAs predichos | 44 | 33 | 304 |
| GenBank Accession | LGR01000000 | QGDG00000000 | QGDH00000000 |

Tabla 1. Resultados de la secuenciación, ensamblaje y predicción de genes de los genomas de *S. lycopersici* estudiados

Los estudios de mitogenómica comparativa mostraron rearrreglos estructurales dentro del orden Pleosporales, evidenciando la plasticidad de los genomas mitocondriales. El estudio filogenético exhaustivo del *Subphylum pezizomycotina* basado en secuencias mitocondriales, permitió reconstruir sus relaciones de acuerdo con lo descrito en estudios genómicos.

Cuando los aislamientos crecen en APG, producen compuestos similares, aunque en distinta concentración. Cuando crecen en agar V8, CIDEFI 216 producen compuestos adicionales. La fluorescencia de los extractos es función del aislamiento y del medio de cultivo. La mayor fluorescencia se encontró en los extractos de CIDEFI 216 creciendo en APG. Finalmente, únicamente los extractos de este aislamiento provocaron sintomatología de la enfermedad en ensayos de hoja desprendida, siendo significativamente mayor el efecto cuando el hongo creció en agar V8.

b) Bacterias endófitas. Se identificaron 3 phyla predominantes en todos los tejidos estudiados, sin embargo, la abundancia relativa de cada phylum fue diferente en cada uno de los 4 tejidos (Figura 1).

Se obtuvieron e identificaron 21, aislados de las semillas de dos cultivares de tomate, Silverio y Elpida. El 76% de los aislados pertenecieron al *Phylum firmicutes*. A este phylum pertenecen géneros bacterianos como *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Psychrobacillus*, que forman esporas, lo que podría conferirles una ventaja adaptativa para sobrevivir en la semilla. Once de los endófitos aislados mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento fúngico, evidenciado por un menor diámetro de colonia comparado con el control (Figura 2).

El sobrenadante libre de células se aplicó en tres concentraciones (1, 10 y 20% v/v) al medio de cultivo donde creció cada hongo. El sobrenadante del cultivo del aislado E7 fue el más efectivo en la inhibición de los 3 hongos fitopatógenos. Por otro lado, el crecimiento micelial de *Alternaria*, *Stemphylium* y *Corynespora* fue inhibido por compuestos volátiles producidos por E7, E9, S15, SE37 y Er-S. La exposición de los hongos al sobrenadante libre de células de E7 y a los compuestos volátiles de E7, E9, S15, SE37 y Er-S produjo alteraciones morfológicas en las hyphas fúngicas.

En el ensayo a campo, los tratamientos no mostraron diferencias significativas en cuanto al número de hojas, largo de la hoja y altura de la planta. De modo indistinto se observó la patología del moho de la hoja del tomate (Tabla 2). Sin embargo, no se justificó el control químico debido a la baja incidencia de la patología. No se evidenció la presencia de otras patologías de importancia en los cultivos.

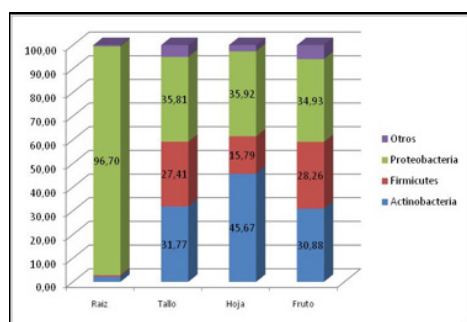


Figura 1. Perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas en cada tejido vegetal (raíz, tallo, hoja y fruto). Abundancia relativa a nivel de *phylum* (>0.5%)

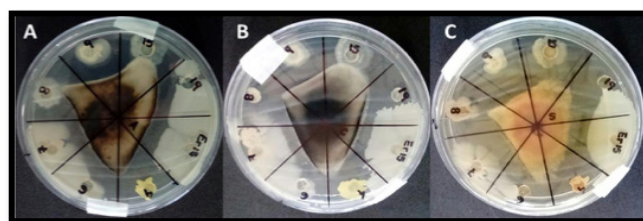


Figura 2. Efecto antagónico de los aislados E4, E6, E7, E8, E9, S15, S19 y Er-S sobre el crecimiento de *A. A. alternata* B. S. *lycopersici* C. C. *cassicola*

| Tratamiento | Plantas incidentes | Total de plantas | Incidencia [%] |
|-------------|--------------------|------------------|----------------|
| 1 | 8 | 60 | 13,3 |
| 2 | 5 | 60 | 8,3 |
| 3 | 4 | 60 | 6,7 |
| 4 | 5 | 60 | 8,3 |
| 5 | 7 | 60 | 11,7 |
| 6 | 8 | 60 | 13,3 |
| Total | 37 | 360 | 10,3 |

Tabla 2. Resultados de incidencia del ensayo realizado a campo

CONCLUSIONES

Passalora fulva es un patógeno de tomate del que sólo se reportaron dos razas en el cinturón hortícola que rodea a la ciudad de La Plata. Los polimorfismos de los genes de avirulencia indican que es probable que aparezcan nuevas razas. El análisis de los genomas de varios aislados de *Stemphylium lycopersici*, con características fenotípicas distintas, mostró que en el genoma ocurren con frecuencia rearrreglos. El genoma mitocondrial fue una herramienta clave para estudiar las relaciones taxonómicas de este hongo. Las plantas de tomate contienen organismos endófitos con actividad de promoción del crecimiento y capacidad antimicrobiana frente a patógenos, de manera que su presencia en las plantas impacta en la sanidad del cultivo. Las bacterias promotoras del crecimiento y *Trichoderma* actúan tempranamente en el cultivo de tomate, lo que no se vió reflejado en los rendimientos del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- BORNET & BRANCHARD (2001). *Plant molecular biology reporter*, 19(3), 209-215. *et al.*
- FRANCO (2015). *Genome announcements*, 3(5), e01069-15.
- FRANCO *et al.* (2017A). *European journal of plant pathology*, 149(4), 983-1000.
- FRANCO *et al.* (2017B). *PloS one*, 12(10), e0185545.
- LÓPEZ *et al.* (2018). *Agronomy*. doi:10.20944/preprints201806.0249.v1.
- MEDINA *et al.* (2015). *Plant Disease*, 99(12), 1732-1737.
- MEDINA *et al.* (2018). *Science of the Total Environment*, 618, 518-530.
- ROLLAN *et al.* (2013). *Plant Disease*, 97(7), 992-992.
- STERGIOPOULOS *et al.* (2007). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(10), 1271-1283.